

Rec'd PCT/PTO 19 JUL 2004

PCT/DE 00/00124

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

10/501962



REC'D 18 MAR 2003

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 01 862.6

Anmeldetag: 18. Januar 2002

Anmelder/Inhaber: Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, Heidelberg/DE

Bezeichnung: Konjugat zur Behandlung prokaryontischer Infek-
tionen

IPC: A 61 K 48/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 25. Februar 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Joachim Waasmaier

Waasmaier

A 9161
02/00
EDV-L

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

150100

Zusammenfassung

Konjugat zur Behandlung prokaryontischer Infektionen

Beschrieben wird ein Konjugat zur Behandlung prokaryontischer Infektionen aus einem die prokaryontische Zellmembran passierenden Transportvermittler und einer gewünschten, in den Prokaryonten einzubringenden und gegen diesen gerichtete Verbindung, bei der es sich vorzugsweise um eine Peptid-Nukleinsäure (PNA) handelt, die gegen ein Gen des Prokaryonten gerichtet ist, das eine Antibiotikumresistenz verleiht.

Unser Zeichen: K 2966 - sch / msl

Konjugat zur Behandlung prokaryontischer Infektionen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat zur Behandlung prokaryontischer Infektionen aus einem die prokaryontische Zellmembran passierenden Transportvermittler und einer gewünschten, in den Prokaryonten einzubringenden und gegen diesen gerichtete Verbindung, bei der es sich vorzugsweise um eine Peptid-Nukleinsäure(PNA) handelt, die gegen ein Gen des Prokaryonten gerichtet ist, das eine Antibiotikaresistenz verleiht.

Weltweit sind bakterielle Infektionen auf dem Vormarsch, die mit den bisher zur Verfügung stehenden Antibiotika aufgrund von Resistenzbildung nicht mehr behandelbar sind. Kritisch ist vor allem die Lage in Kliniken, z.B. auf Intensivstationen, wo täglich Antibiotika verabreicht werden und daher Erreger leicht Resistenzen ausbilden können. Auch gerade der falsche oder zu häufige Gebrauch von Antibiotika hat zu einer raschen Zunahme resistenter Bakterienstämme geführt. Zwar wurde bisher das Problem dadurch gelöst, dass alternative bzw. neuentwickelte Antibiotika eingesetzt wurden (z.B. Cephalosporine/derivatisierte Antibiotika), Kombinationstherapien (z.B. Cotrimoxazol/Sulfonamide), aber auch hier treten in relativ kurzer Zeit neue Resistenzen auf. So ist z.B. auch Vancomycin, bisher vor kurzem noch gegen bestimmte Bakterienstämme wirksam, aufgrund der inzwischen gebildeten Resistenzen oft nicht mehr therapeutisch einsetzbar. Zwar werden zur Entwicklung neuer natürlicher Antibiotika verschiedenen Ursprungs aus Pro- und Eukaryonten sehr große Anstrengungen unternommen, gegen die rasch mutierenden Bakterienstämme konnten jedoch nur temporäre bzw. Teilerfolge erzielt werden.

Somit liegt der Erfindung im wesentlichen das technische Problem zugrunde, Mittel bereitzustellen, die eine wirksame Therapie von Erkrankungen ermöglichen, die in Zusammenhang mit gegen Antibiotika resistenten Prokaryonten, z.B. Bakterien stehen.

Die Lösung dieses technischen Problems erfolgte durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen.

Von den Erfindern wurde zur Erzielung der Lösung des technischen Problems so vorgegangen, dass eine erneute Sensibilisierung der Bakterien gegenüber den (klassischen oder modernen) Antibiotika, gegen die sie resistent waren, durchgeführt wurde. Für diese Sensibilisierung wurde ein Konjugat entwickelt, das die folgenden Komponenten umfaßt:

- (a) einen Transportvermittler für die prokaryontische Zellmembran, d.h. vorzugsweise ein per se antibakterielles Peptid (z.B. Defensin), das aufgrund seiner Ladung und Struktur durch Porenbildung die bakterielle Zellwand passieren und auch schädigen kann und (b) die in den Prokaryonten einzubringende Verbindung, z.B. eine Peptid-Nukleinsäure (PNA), die vorzugsweise gegen ein Gen gerichtet ist, das dem Prokaryonten eine Antibiotikaresistenz verleiht.

In den zu der vorliegenden Erfindung führenden Beispielen konnte gezeigt werden, dass an Ampicillin/Neomycin resistenten Bakterien (*E. coli*), die mit spezifischen Defensin-Konjugat-PNAs_{Ampicillin/Neomycin} behandelt wurden, eine erfolgreiche Überwindung der Antibiotikaresistenz erreicht wurde. Somit stellen die erfindungsgemäßen Konjugate eine neue Klasse von Antibiotika dar, die die bakteriellen Abwehrmechanismen überwinden können, bzw. mit deren Hilfe es möglich ist, bereits bekannten klassischen Antibiotika, wie z.B. Benzylpenicillinen, Tetracyclinen und Neomycinen, deren ursprüngliche Wirkungseffizienz wieder zu verleihen. Dieser

Weg weicht völlig von den bisherigen Therapie- bzw. Forschungsstrategien ab, ergänzt diese jedoch sehr erfolgversprechend. Die mittels der vorliegenden Erfindung durchführbare (Doppel)strategie ist einerseits spezifisch gegen prokaryontische, z.B. bakterielle Membranen gerichtet und für Prokaryonten toxisch, andererseits lassen sich mit den erfindungsgemäßen Konjugaten gegen Prokaryonten gerichtete Verbindungen einschleusen, z.B. speziell gegen bakterielle Gene gerichtete antisense-Nukleinsäuren (anti-Gen-Nukleinsäuren), z.B. PNAs, Peptid-Domänen, modifizierte Nukleotide, Inhibitoren von Enzymen etc..

Die erfindungsgemäßen Konjugate weisen somit u.a. die folgenden Vorteile auf: (a) Für deren Etablierung wird kein aufwändiges Screening-Verfahren benötigt und (b) in einer besonderen Ausführungsform kann die Revitalisierung klassischer Antibiotika durch Blockieren der prokaryontischen Resistenzmechanismen auf Nukleinsäure-Ebene erzielt werden, wodurch die „alten“ Antibiotika, die bisher aufgrund ihrer mangelnden Wirksamkeit oft nicht mehr eingesetzt werden konnten, wieder eine Bedeutung erlangen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Konjugat, das zur Behandlung prokaryontischer Infektionen geeignet ist und die folgenden Komponenten aufweist:

- (a) einen die prokaryontische Zellmembran passierenden Transportvermittler; und
- (b) eine in den Prokaryonten einzubringende und gegen diesen gerichtete Verbindung.

Der hier verwendete Begriff „in den Prokaryonten einzubringende und gegen diesen gerichtete Verbindung“ betrifft jede Verbindung, die für den Prokaryonten schädlich ist, z.B. zu dessen Abtötung führt oder dessen Wachstum bzw. Teilung verhindert. Geeignete Verbindungen sind dem Fachmann

bekannte und dazu zählen z.B. Anti-Metaboliten, modifizierte Nukleotide etc..

Bezüglich Verfahren zur Herstellung der einzelnen Komponenten der Konjugate und zu deren Verknüpfung wird auf die deutsche Patentanmeldung Nr. 199 33 492.7 sowie die nachstehenden Beispiele verwiesen. Die Ankopplung der anderen Bestandteile (z.B. Spacer und/oder PNA) an den Transportvermittler erfolgt jedenfalls durch kovalente chemische Bindung. Gegebenenfalls kann die Einfügung einer Redoxspaltstelle (-S-S-) zwischen Transportvermittler und einzuschleusender Verbindung auf chemischen Wege über eine Redoxkopplung erfolgen. Auch zwischen einem ggf. vorhandenen Spacer und der einzubringenden Verbindung, z.B. der PNA, liegt eine kovalente Bindung vor, bevorzugt eine Säureamid-Bindung. Mögliche Alternativen sind Ether- oder Ester-Bindungen, je nach den in der zu konjugierenden Verbindung vorhandenen funktionellen Gruppe(n).

Das erfindungsgemäße Konjugat eignet sich zur Behandlung aller prokaryontischer Infektionen, z.B. Infektionen mit Bakterien, vorzugsweise humanpathogenen Bakterien, Mycoplasmen oder Hefen.

Der Transportvermittler des erfindungsgemäßen Konjugats ist vorzugsweise ein Peptid oder Protein, das die prokaryontische Zellmembran passieren und die gewünschte Verbindung in das Zytoplasma einschleusen kann. Die Länge dieses Peptids bzw. Proteins unterliegt keiner Beschränkung, solange es die obige Eigenschaft aufweist. Hergestellt wird der ausgewählte Transportvermittler vorzugsweise auf biologischem Weg (Reinigung natürlicher Transportvermittlerproteine/peptide oder Klonierung und Expression der Sequenz in einem eukaryotischen oder prokaryotischen Expressionssystem), bevorzugt aber auf synthetischem Weg, z.B. nach dem

Merrifield-Verfahren (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 2149).

Vorzugsweise handelt es bei diesem Transportvermittler um eine Verbindung, die per se bereits für den Prokaryonten schädlich ist, z.B. dadurch, dass sie zu einer Membranschädigung (z.B. durch Bildung von Poren oder Läsionen) führt. Dabei handelt es sich vorzugsweise um Defensine oder Holine (Bakteriophagen-Proteindomänen).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Konjugat einen Transportvermittler, der ein Phagen-Holin-Protein umfaßt, wobei ein Phagen-Holin-Protein mit einer der in Figur 3 dargestellten Aminosäuresequenzen oder Fragmente oder Varianten davon, die noch die prokaryontische Zellmembran passieren können, noch mehr bevorzugt sind.

Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Begriffe „Variante“ oder „Fragment“ umfassen Proteine/Peptide mit Aminosäuresequenzen, die sich gegenüber den in Figur 3 angegebenen Sequenzen durch Deletion(en), Insertion(en), Austausch(e) von Aminosäureresten und/oder andere im Stand der Technik bekannte Modifikationen unterscheiden bzw. ein Fragment des ursprünglichen Proteins/Peptids umfassen, wobei die Varianten bzw. Fragmente des Proteins/Peptids im Wesentlichen noch die biologischen Eigenschaften des Ausgangsproteins/peptids aufweisen, d.h. die prokaryontische Zellmembran passieren können. Verfahren zur Erzeugung der vorstehenden Änderungen in der Aminosäuresequenz sind dem Fachmann bekannt und in Standardwerken der Molekularbiologie beschrieben, beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989)). Der Fachmann ist auch in der Lage zu bestimmen, ob ein solches Protein bzw.

Peptid noch über die gewünschten biologischen Eigenschaften verfügt, beispielsweise mit den in den nachstehenden Beispielen beschriebenen Verfahren.

In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats umfaßt der Transportvermittler ein Defensin, vorzugsweise ein humanes Defensin. Bei den Defensinen handelt es sich um Polypeptide bzw. Peptide mit antimikrobieller Wirkung, die wichtige Faktoren bei der angeborenen Immunität von Vertebraten und Nicht-Vertrebatem darstellen. Defensine wurden z.B. aus Tieren (einschl. dem Menschen), Pflanzen und Insekten isoliert. Sie bestehen in der Regel aus 29 bis 42 Aminosäuren und enthalten drei Disulfidbrücken, die von drei Cysteinpaaren gebildet werden. Für die vorliegenden Erfindung geeignete Defensine sind z.B. in Tang et al., *Science* 286 (1999), 498; Saido-Sakanaka et al., *Biochem. J.* 338 (1999), 29; Raj et al., *Biochem. J.* 347 (2000), 633; Yu et al., *J. Biol. Chem.* 275(No.6) (2000), 3943 beschrieben.

In einer noch mehr bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats ist die in den Prokaryonten einzubringende Verbindung eine gegen die Expression eines Gens gerichtete Peptid-Nukleinsäure (PNA). Der Einsatz der protease- und nukleaseresistenten Peptid-Nukleinsäuren („PNAs“), bei denen es sich um Oligonukleotid-Derivate handelt, bei denen das Zuckerphosphat-Rückgrat bevorzugt durch Ethyl-Amin verbundene α -Amino-Ethyl-Glycin-Einheiten substituiert ist, erlaubt aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften unter physiologischen Bedingungen eine stabile und effiziente Blockierung der Transkription der gewünschten Gene. Mit diesen PNAs wird eine auf dem Antisense-Prinzip basierende Anti-Gen-Strategie verfolgt, bei der jedoch nicht die mRNA, sondern das Gen selbst das Ziel ist. Dabei hybridisieren die PNAs über die Bildung einer Triple-Helix an

die Ziel-DNA. Der Zielbereich kann einerseits ein transkribierter Bereich des zu blockierenden Gens, z.B. des eine Antibiotikaresistenz verleihenden Gens sein, andererseits ein regulatorischer Bereich, dessen Blockierung über die PNAs ebenfalls die Transkription hemmt. Geeignete Bereiche können vom Fachmann anhand der bekannten DNA-Sequenzen bzw. deren Funktion identifiziert werden. Vorzugsweise weisen die Peptid-Nukleinsäuren eine Länge von mindestens 15 Basen auf, besonders bevorzugt sind Peptid-Nukleinsäuren mit einer Länge von mindestens 18 Basen, ganz bevorzugt von mindestens 21 Basen und am meisten bevorzugt von mindestens 23 Basen. Die Peptid-Nukleinsäure kann ggf. auch markiert sein, z.B. radioaktiv, mit einem Farbstoff, mit Biotin/Avidin usw. Die Synthese von PNAs ist dem Fachmann bekannt und z.B. auch in Nielsen et al., Science 254 (1991), 1497-1500, beschrieben. Der hier verwendete Begriff „Gen“, umfaßt nicht nur Gene des Genoms des Prokaryonten, sondern auch Gene auf extra-genomischen Elementen, z.B. Plasmiden etc..

In einer sogar noch mehr bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats ist die Peptid-Nukleinsäure (PNA) gegen ein Gen gerichtet, das eine Antibiotikaresistenz verleiht, vorzugsweise ist die Antibiotikaresistenz eine Penicillin-, Ampicillin-, Kanamycin- oder Tetracyclin-Resistenz.

Weiter kann das Konjugat ggf. einen Spacer enthalten, der sich zwischen dem Transportvermittler und der zu transportierenden Verbindung, z.B. der Peptid-Nukleinsäure (PNA), befindet. Der Spacer dient dazu, ggf. vorhandene sterische Wechselwirkungen zwischen den Komponenten aufzuheben bzw. günstig zu beeinflussen.

Die Struktur des erfindungsgemäßen Konjugats ist

vorzugsweise: Transportvermittler-Spacer-einzubringende Verbindung. Besonders bevorzugt sind die Spacer Polylysin, Polyglycin oder Poly(Glycin/Lysin). Für die erfindungsgemäßen Zwecke liegt die Länge des Spacers vorzugsweise in einem Bereich von 2 bis 6 Aminosäuren. Vorzugsweise ist der Spacer über eine spaltbare Disulfidbrücke (-S-S-) mit dem Transportvermittler verknüpft.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats umfaßt die Peptid-Nukleinsäure (PNA) die folgende Sequenz: ATTGTTAGATTTCAT (Orientierung: N-Terminus/Sequenz/C-Terminus).

Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich auch ein erfindungsgemäßes Konjugat, gegebenenfalls zusammen mit einem geeigneten Träger, enthaltendes Arzneimittel. Vorzugsweise enthält das Arzneimittel außerdem ein Antibiotikum, für das der Prokaryont durch Verabreichung des Konjugats sensibilisiert wurde. Geeignete Träger und die Formulierung derartiger Arzneimittel sind dem Fachmann bekannt. Zu geeigneten Trägern zählen beispielsweise Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen, etc.. Die Verabreichung der Arzneimittel erfolgt vorzugsweise parenteral, transdermal oder subcutan. Die geeignete Dosierung wird von dem behandelnden Arzt bestimmt und hängt von verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise von dem Alter, dem Geschlecht, dem Gewicht des Patienten, der Art und dem Stadium der Infektion, der Art der Verabreichung etc..

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines erfindungsgemäßen Konjugats zur Behandlung einer prokaryontischen Infektion, wobei diese Infektion vorzugsweise von einem Prokaryonten verursacht ist, der eine Resistenz gegenüber einem Antibiotikum aufweist.

Legenden zu den Figuren:

Figur 1: Schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Konjugats mit Defensin als Transportvermittler und einer gegen eine Ampicillin- bzw. Kanamycin-Resistenz gerichteten PNA

Figur 2: Darstellung eines Teilbereichs der pDNA von Plasmid pBR322 einschl. der für die Konstruktion eines PNA-Konjugats verwendeten Sequenzen

Die Sequenz der gegen eine Ampicillin-Resistenz gerichteten Anti-Gen-PNA ist in der Figur unten gezeigt. Der unterstrichene Bereich aus der beta-lactamase kodierenden pDNA-Sequenz von pBR322 entspricht dem Zielbereich für das PNA-Konjugat.

Figur 3: Zusammenstellung von Holin-Protein-Sequenzen, die als Transportvermittler in den erfindungsgemäßen Konjugaten geeignet sind.

Die Aminosäuresequenzen der 28 einzelnen Holine sind im Einbuchstaben-Code dargestellt.

Figur 4: Ergebnisse der Behandlung von (durch Transformation mit pBR322 gegen Ampicillin bzw. mit pEGFP-N₁ (Clontech, Deutschland, Heidelberg) gegen Kanamycin resistenten kompetenten E.coli mit oder ohne (Kontrolle) den erfindungsgemäßen Konjugaten

Obere Reihe: Kanamycin-Nährboden + Kanamycin-Resistenz-Konjugat (500 nM); untere Reihe: Ampicillin-Agar + Ampicillin-Resistenz-Konjugat (500 nM); linke Spalten: Kontrollen (ohne PNA-Konjugate). Ein deutlicher Effekt der erfindungsgemäßen Konjugate (Wiedererlangung der Antibiotika-Sensitivität) ist zu beobachten.

Figur 5: Ergebnisse der Behandlung von gegen Kanamycin

resistenten intakten (nicht-kompetenten) *E.coli* mit oder ohne (Kontrolle) den erfindungsgemäßen Konjugaten

Obere Reihe: Kanamycin-Nährboden + Kanamycin-Resistenz-Konjugat (2 μM); untere Reihe: Kanamycin-Nährboden + Kanamycin-Resistenz-Konjugat (20 μM); linke Spalten: Kontrollen (ohne PNA-Konjugate). Ein deutlicher Effekt der erfindungsgemäßen Konjugate (Wiedererlangung der Antibiotika-Sensitivität) ist bereits bei einer Konzentration von 2 μM zu beobachten, bereits bei 20 μM werden alle Bakterien wieder sensibilisiert, d.h. abgetötet.

Figur 6: Ergebnisse der Behandlung von gegen Kanamycin resistenten intakten (nicht-kompetenten) *E.coli* mit verschiedenen Konzentrationen der erfindungsgemäßen Konjugate zur Ermittlung der optimalen Bakterienkonzentration zur Quantifizierung

Es wurden Kanamycin-Nährböden verwendet, auf die resistente Bakterien ausplattiert wurden. Zur Ermittlung der optimalen Bakterienkonzentration wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Kanamycin-Resistenz-Konjugat in abnehmenden Zehnerpotenzen verwendet.

Figur 7: Ergebnisse der Behandlung von gegen Kanamycin bzw. Ampicillin resistenten intakten (nicht-kompetenten) *E.coli* mit den erfindungsgemäßen Konjugaten

Platte K1: Kontrolle, Platte 2: 250 nM Kanamycin-Resistenz-Konjugat; Platte 3: 250 nM Ampicillin-Resistenz-Konjugat. Die Ergebnisse zeigen Bakterienhemmung für Ampicillin und Kanamycin bei 250 nM Konjugat.

Figur 8: Ergebnisse der Behandlung von gegen Ampicillin resistenten intakten (nicht-kompetenten) *E.coli* mit den erfindungsgemäßen Konjugaten

wie bei Figur 7; K2: Kontrolle, Platte 4: 250 nM Ampicillin-

Resistenz-Konjugat.

Figur 9: Ergebnisse der Behandlung von gegen Kanamycin resistenten intakten (nicht-kompetenten) E.coli mit den erfindungsgemäßen Konjugaten

wie bei Figur 6; Kl: Kontrolle; Platte 1: 2,5 µM Kanamycin-Resistenz-Konjugat; Platte 2: 250 nM Kanamycin-Resistenz-Konjugat.

Figur 10: Struktur des für die erfindungsgemäßen Konjugate verwendeten Defensins nach Zyklisierung (oben) und nach Bildung dreier Disulfidbrücken (links unten)

Die hypothetische räumliche Struktur ist rechts unten dargestellt.

Figur 11: Ergebnisse der Behandlung von HeLa-Zellen mit einem erfindungsgemäßen Konjugat

A: unbehandelte Kontrolle

B: Mit dem erfindungsgemäßen Konjugat behandelte Zellen

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben.

Beispiel 1

Allgemeine Verfahren

(A) Zellkultur

Die Bakterien wurden auf Agar mit LB-Medium (und den entsprechenden Antibiotika) ausplattiert und ü.N: bei 37°C inkubiert. HeLa-Zellen wurden in Flüssigkultur gemäß üblichen Bedingungen gezüchtet.

(B) PNA-Synthese

Peptidnukleinsäure (PNA) imitiert eine DNA und wurde ursprünglich als Reagens zur sequenzspezifischen Erkennung doppelsträngiger DNA über eine konventielle Tripelhelix-Bildung entwickelt. Für die Festphasensynthese wurde die Fmoc-Strategie mittels einem vollautomatisierten Synthesegerät (Syro II, MultisynTech, Witten, Deutschland) verwendet. Die Synthese wurde an einem 0,05 mmol Fmoc-AS-Polystyrenharz (1% quervernetzt) durchgeführt. Als Kopplungsreagenz wurde 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluroniumhexafluorphosphat (HBTU) verwendet. Die Seitenketten schützenden Gruppen waren Lys(Boc), Asp(Obut), Ser(But), Cys(Trt) und Asn(Trt). Das geschützte Peptidylharz wurde mit 20% Piperidin in Dimethylformamid behandelt. Die Spaltung und Abspaltung der Schutzgruppen wurde durch Behandlung mit 90% Trifluoressigsäure, 5% Äthandithiol, 2,5% Thioanisol und 2,5% Phenol (Vol./Vol./Vol.) für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur erzielt. Alle Produkte wurden in Äther präzipitiert und über präparative HPLC (Shimazu LC-8A, Shimazu, Duisburg, Deutschland) auf einer YMC ODS-A 7A S-7 µm Umkehrphasen-HPLC-Säule (20 x 250 mm) unter Verwendung von 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser (A) und 60% Acetonitril in Wasser (B) als Elutionsmittel gereinigt. Die Peptide wurde mit einem linearen Gradienten von 25% B bis 60% B innerhalb von 40 Min. bei einer Durchflußrate von 10 ml/Min. eluiert. Die dem gereinigten Konjugat entsprechenden Fraktionen wurden lyophilisiert. Sequenzen von Einzelmolekülen sowie das vollständige bimodulare Konstrukt wurden über analytische HPLC (Shimadzu LC-10) und Laser-Desorptionsmassenspektroskopie (Finnigan Vision 2000, Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) wie nachstehend angegeben charakterisiert.

Die Sequenz der gegen eine Ampicillin-Resistenz gerichteten PNA war wie folgt: H₂N-ATTGTTAGATTTTCAT-COOH. Dabei handelt es sich um eine Sequenz, die mit dem Bereich von Pos.86 bis

Pos.100 der pDNA von pBR322 (GeneBank-Zugangs-Nr. J01749) hybridisieren kann. Die Sequenz der gegen Kanamycin-Resistenz verwendeten PNA war $\text{H}_2\text{N-TCTTGTTCAATCAT-COOH}$.

(C) Chemische Synthese von Defensin

Für die Festphasensynthese von Defensin (vgl. Figur 10 hinsichtlich der Aminosäuresequenz und Struktur) wurde die Fmoc-Strategie (Merrifield, J.Amer.Chem.Soc. 85 (1963), 2149-2154; Ruegg und Rudinger, Methods Enzymol. 47 (1977), 111-126) mit einem vollautomatischen Synthesegerät (ABI 431; Applied Biosystems, Deutschland, Darmstadt) verwendet. Die Synthese wurde an einem 0,05 mmol Fmoc-Arg(Pbf)-Polystyrenharz (1% quervernetzt) durchgeführt. Als Kopplungsreagenz wurde 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) verwendet. Die Seitenketten schützenden Gruppen waren: Thr(But), Arg(Pbf). Für Cys wurden drei verschiedene selektiv spaltbare Schutzgruppen verwendet. Für Cys(3,15) wurde t-Butylthio verwendet, für Cys(5,13) Acetamidomethyl und für Cys(7,11) eine Tritylgruppe.

Im ersten Schritt wurde die t-Butylthio-Schutzgruppe mit Tris(2-Carboxyethyl)phosphin (TCEP) gespalten und die Schwefelbrücke mit 20% DMSO in Wasser gespalten. Im zweiten Schritt wurde die Acetamidomethyl-Schutzgruppe gespalten und zur gleichen Zeit die zweite Schwefelbrücke mit einer 0,01 mol Jod-Lösung oxidiert. Das geschützte Peptidylharz wurde 12 Min. mit 20% Piperidin in Formamid behandelt und danach gründlich mit Dimethylformamid gewaschen. Die Spaltung und Entfernung der Schutzgruppen vom Peptidharz erfolgte durch Behandlung mit 90% Trifluoressigsäure, 5% Ethandithiol, 2,5% Thioisanol und 2,5% Phenol (V./V./V./V.) für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur. Das Produkt wurde in Äther präzipitiert. Das Rohmaterial wurde über präparative HPLC (Shimazu LC-8A, Shimazu, Duisburg, Deutschland) auf einer YMC-Pack ODS-A, S-5

μ m Umkehrphasen-HPLC-Säule (20 x 150 mm) unter Verwendung von 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser (A) und 60% Acetonitril in Wasser (B) als Elutionsmittel gereinigt. Das Peptid wurde mit einem linearen Gradienten von 25% B bis 60% B innerhalb von 40 Min. bei einer Durchflußrate von 20 ml/Min. eluiert. Die dem gereinigten Peptid entsprechenden Fraktionen wurden lyophilisiert.

Als letzter Schritt wurden eine Kopf/Schwanz-Zyklisierung mit Propanphosphonicacid-anhydrid (T3P) durchgeführt und das Reinigungsverfahren wiederholt. Das gereinigte Material wurde über analytische HPLC (Shimadzu LC-10) und Laser-Desorptionsmassenspektroskopie (Finnigan Vision 2000, Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) charakterisiert.

Peptidreinigung:

Gradient: analyt. 5%→80% (in einem Zeitraum von 35 Min.);

präparativ: 5%→80% (in einem Zeitraum von 40 Min.);

Reinheit: >90%.

(D) Verknüpfungsreaktionen

Die Verknüpfungsreaktionen erfolgten wie in der deutschen Patentanmeldung Nr. 199 33 492.7 beschrieben unter milden oxidativen Bedingungen (DMSO/H₂O). Dazu wurden Cysteingruppen des Defensins und des Spacers H-S-Gly und der PNA in einem Bereich von 2 mg/ml in einer 20% DMSO/Wasser-Lösung oxidiert. Die Reaktion war nach etwa 5 Stunden vollständig abgelaufen. Das Fortschreiten der Oxidation wurde über eine analytische C18 Umkehrphasen-HPLC überwacht (Tam et al., J.Amer.Chem.Soc. 113 (1991)). Die Komponenten wurden nach der Merrifield-Methode verknüpft (Merrifield, J. Americ. Chem. Soc. 85 (1963), 2149).

Das so synthetisierte PNA-Modul weist folgende Struktur auf:

DEFENSIN_{human}-SOS-(Gly)_x-PNA_{Amp^R/Neo^R}
X = 1-5

Die Aufreinigung erfolgte mittels Umkehrphasen-HPLC, anschließend wurde lyophilisiert. Nach Bestimmung der Masse mittels MS wurde das Lyophilisat in einem definiertem Volumen physiologischer Kochsalzlösung zu einer Stammlösung von 10 µM gelöst.

Beispiel 2

Bestimmung der Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Konjugate bei antibiotikaresistenten *E.coli*-Stämmen

Resistente Bakterien wurden auf übliche Agarplatten mit und ohne Antibiotikum konfluent ausplattiert und zum Teil mit den erfindungsgemäßen Konjugaten behandelt. In einem Vorexperiment wurden bereits kompetente *E.coli* (d.h. mit bereits durchlöcherten Membranen) verwendet; siehe Figur 4; Obere Reihe: Kanamycin-Nährboden + Kanamycin-Resistenz-Konjugat (500 nM); untere Reihe: Ampicillin-Agar + Ampicillin-Resistenz-Konjugat (500 nM); linke Spalten: Kontrollen. Ein deutlicher Effekt der erfindungsgemäßen Konjugate (Wiedererlangung der Antibiotika-Sensitivität) ist zu beobachten.

In den darauf folgenden (in den Figuren 5 bis 9 dargestellten) Experimenten wurden intakte (nicht-kompetente) *E.coli* verwendet und die gegen eine Antibiotikumresistenz gerichteten Konjugate in unterschiedlichen Verdünnungen getestet. Hinsichtlich der verwendeten Bakterien, Antibiotika und Konzentrationen wird auf die Legenden der Figuren verwiesen. Jedenfalls zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen deutlich, dass die erfindungsgemäßen Konjugate

16

mit einer PNA, die gegen ein Gen gerichtet ist, das eine Anitbiotikaresistenz verleihen kann, eine erneute Sensibilisierung des Bakteriums für das betreffende Antibiotikum bewirken und diese somit mit diesem Antibiotikum wieder bekämpft werden können.

Die nicht-toxische Wirkung dieses Konjugats auf eukaryontische Zellen (HeLa-Zellen) konnte durch Inkubation der Zellen mit/ohne Konjugat (in Konzentrationen wie für die Experimente mit Bakterien) nachgewiesen werden; siehe Figuren 11A und 11B.

19

Patentansprüche

1. Konjugat, das zur Behandlung prokaryontischer Infektionen geeignet ist und die folgenden Komponenten aufweist:

- (a) einen die prokaryontische Zellmembran passierenden Transportvermittler; und
- (b) eine in den Prokaryonten einzubringende und gegen diesen gerichtete Verbindung.

2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei der Prokaryont ein Bakterium ist.

3. Konjugat nach Anspruch 2, wobei das Bakterium ein humanpathogenes Bakterium ist.

4. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Transportvermittler ein Peptid oder Protein ist, das die prokaryontische Zellmembran passieren kann.

5. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Transportvermittler ein Phagen-Holin-Protein umfaßt, das eine der in Figur 3 dargestellten Aminosäuresequenzen umfaßt oder ein Fragment oder eine Variante davon, das (die) die prokaryontische Zellmembran passieren kann.

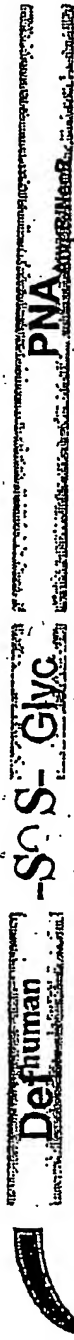
6. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Transportvermittler ein Defensin umfaßt.

7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die einzubringende Verbindung eine gegen die Expression eines Gens gerichtete Peptid-Nukleinsäure (PNA) ist.

8. Konjugat nach Anspruch 7, wobei die Peptid-Nukleinsäure (PNA) gegen ein Gen gerichtet ist, das eine Antibiotikum-Resistenz verleiht.

9. Konjugat nach Anspruch 8, wobei die Antibiotikum-Resistenz eine Penicillin-, Ampicillin-, Kanamycin- oder eine Tetracyclin-Resistenz ist.
10. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, das folgende Struktur hat: Transportvermittler-Spacer-einzubringende Verbindung.
11. Konjugat oder Konjugat-Gemisch nach Anspruch 10, wobei der Spacer Polylysin, Polyglycin oder Poly(Glycin/Lysin) ist.
12. Konjugat nach Anspruch 10 oder 11, wobei der Spacer über eine spaltbare Disulfidbrücke mit dem Transportvermittler verknüpft ist.
13. Konjugat nach einem der Ansprüche 7 bis 12, wobei die Peptid-Nukleinsäure die Sequenz $\text{H}_2\text{N-ATTGTTAGATTTCAT-COOH}$ umfaßt.
14. Arzneimittel, ein Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 13 enthaltend.
15. Arzneimittel nach Anspruch 14, außerdem mindestens ein Antibiotikum enthaltend, für das der Prokaryont durch die Verabreichung des Konjugats wieder sensibilisiert wurde.
16. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 13 oder der in Anspruch 15 definierten Zusammensetzung zur Behandlung einer prokaryontischen Infektion.
17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die prokaryontische Infektion durch einen Prokaryonten verursacht ist, der eine Resistenz gegenüber mindestens einem Antibiotikum aufweist.

Strategien:



spezifisch gegen bakterielle Membranen

+

speziell gegen bakterielle Gene gerichtete Anti-Gen-Strategie

→ Kombinierte 'Doppelstrategie'

Fig. 1

Genom. Wirkort - Anti-Gen-PNA

DEFINITION Cloning vector pBR322, complete genome.
 ACCESSION J01749 - Genbank
 KEYWORDS ampicillin resistance; beta-lactamase; cloning vector; drug resistance protein; origin of replication; plasmid;
 SOURCE Cloning vector pBR322.
 ORGANISM Cloning vector pBR322
 artificial sequence; vectors.

TTCTCATGTT TGACAGCTTA TCATCENAAA GCTTAAATGC GGTAACTTTAT CACAGTTAAA 60
 TTGCTAAGCC AGTCAGGCAC CGTGTATGAA ATCTAACAAT GCGTCAATCG TCATCCCTCG 120
 CACCTCACC CTGCAATCTG TAGGATAGS CTGCTATAG TCGGACTEC CGGCGCTTTT 180
 GCGGATATC GTCCATTCG ACAGATATGC CAGTCACTAT CAGCTCTAC TACCGCTATA 240
 TCGCTTATG CATTCTAT CCGTACCTT TCTCAGACA CTATCCGACC GCTTGGCCG 300
 CCGCCCACTC CTGCTCGCTT CCGTCACTG AGCACTCTC GACTACGCA TCATGCGCAC 360
 CACACCTCTC CTGCTGCTC TCATACCTCG ACCAATCTG GCGGCACTA CCGCGCCAC 420
 AGCTCGCTT GCTCGCGCTT ATATCGCGA CATTACCGT GCGGCACTC GCGCTCGCA 480
 CTTCGCTTC ATCAGCGCTT GTTCGCGCT GGTATCTAG GCGGCGCTC TCGCCGCGG 540
 ACTGCTGGC GCGCTCTCT TCTATCACC ATTCTCTGCG GCGGCGCTC TTAAGCGCT 600

Anti-Gen-PNA

HOOC-TAC TTT AGA TTG TTA-NH₂

Fig. 2

Alignments Holin-Protein, (Phagen) - *Transportprotein*

product="probable holin" (GMSE-1)

[Endosymbiont bacteriophage may influence susceptibility to trypanosome infection in tsetse, Dale and Young]

protein_id="AAG50251.1"

db_xref="GI:12276078"

translation="MPCLHLVVGWSSPGSALIREQAIGAGLAAWMTCLRGRYLGRGWKRKTTFDAAICALIAWF
ARDGLALVGYDNQFSYLSSIVGYLGNDYLGALLRRRLEKKS GESNAPQ

product="holin protein" (Listeria innocua)

protein_id="CAA61518.1"

translation="MMKMEFGKELLVYMTFLVVVTPVFVQAIIKKTTELPSKWLPTVSILVGAILGALATSLDGSG
SLATMIWAGALAGAGGTGLFEQFTNRAKKYKDD

product="holin" (bacteriophage 80 alpha)

specific_host="Staphylococcus aureus RN450

function="makes hole in membrane"

protein_id="AAB39698.1"

db_xref="GI:1763242"

translation="MDINWKLRFKNKAVLTGLVGALFVFIKQVTDLFGLDLSTQLNQASAIIGAILTLTGIGVIT
DPTSKGVSDSSIAQTYQAPRDSKKEEQVTVKSSQDSSLTPELSAKAPKEYDTSQPFTDASNDVGFDVN
EYHHGGGDNASKIN

product="holin" (Staphylococcus bacteriophage phi 11)

note="ORF3; structural homologue of holin"

protein_id="AAA99522.1"

db_xref="GI:511841"

translation="MDINWKLRFKNKAVLTGLVGALFVFIKQVTDLFGLDLSTQLNQASAIIGAILTLTGIGVIT
DPTSKGVSDSSIAQTYQAPRDSKKEEQVTVKSSQDSSLTPELSAKAPKEYDTSQPFTDASNDVGFDVN
EYHHGGGDNASKIN

product="putative holin 1" (Streptococcus pneumoniae bacteriophage MM1)

function="lysis protein"

protein_id="CAC48114.1"

db_xref="GI:15074937"

translation="MKIEFFNFLRSVIQTEDGLVLYALALIVSMEIDFVTGTIAAINDIEYKSKIGINGLLRKISGV
LLLMILIPASVLLPEKTGFALYSICLGYIAFTFQSLIENYRKLKGNVTLFQPIVKVFQRLEKDDDTKKGE

gene="orf87a" (Streptococcus thermophilus bacteriophage Sfi21)

product="holin"

protein_id="CAA64941.1"

db_xref="GI:2292749"

translation="MKKRKKKMINFKLRLQNKATLVALISAVFLMLQQFGLHVPNNIQGINTLVGILVILGIITDP
TTKGIADSERALSIIQPLDDKEYV

gene="hol500" (Bacteriophage A500);(Listeria monocytogenes)

protein_id="CAA59363.1"

/db_xref="GI:853745"

/translation="MMKMEFGKELLVYMTFLVVVTPVFVQAIIKKTTELPSKWLPTVSILVGAILGALATSLDGSG
SLATMIWAGALAGAGGTGLFEQFTNRAKKYKDDK

product="holin" (Bacteriophage PL-1)

protein_id="BAA96748.1"

translation="MQNELLQVLALAFVIAPITTGTFEIKRYTPAEGKLLPVLSIGTG
ILLACVWAMAFGHLPLIGAYALAGMLSGLASVGVYQIVKPNEEVK

Fig. 3(1)

gene="lydA" (Bacteriophage P1) (enterobacteriae)

codon_start=1

product="holin"

protein_id="CAA61014.1"

db_xref="GI:974764"

translation="MLDTQELAPVAIALLLSVIGGIGTFLMDVRDGRQSGNLLGLVTEIFVAVTAGAVAYLLGQH
EGWELSTITYLMVTIASNNGHEVISGMKRVNIDSILNVLTS VKKGGGK

gene="S" (Bacteriophage H-19B)

note="similar to Bacteriophage 21 lysis gene S, encoded by GenBank Accession Number M65239" /

product="putative holin protein"

protein_id="AAD04658.1"

db_xref="GI:2668771"

translation="MEKITTVGSYTTSAVGTGYWLLQLLDKVSPSQWVAIGVLGSLFGLLTLYLTNLYFKIREDR
RKA VRGE

gene="hol" (Bacteriophage A118)

function="forms unspecific lesions into cytoplasmic membrane prior to lysis"

specific_host="Listeria monocytogenes"

note="ORF24; two products may be translated from this gene (hol-96 and hol-93)"

product="holin"

protein_id="CAB53810.1"

db_xref="GI:5823622"

translation="MIEMFEGKELLVYMTFLVVVTPVFVQAIIKKTTELPSKWLPVTSILIGAILGALATFLDQSGS
LATMIWAGALAGAGGTGLFEQFTNRSKKYGEDDK

gene="Hol" (Lactobacillus casei bacteriophage A2)

product="putative holine"

protein_id="CAB87385.1"

db_xref="GI:7573220"

translation="MKINWKVAVLSVKFWLALVPAALLVVQTAAAVFGYNWDFANLGKELTAVINAVFALLTI
VGVAVDPTTEGVSDSQALAYPALITTKAAIKSLEDQIKALQADKAADQATSAASEVVPETSSAAPAE
SAPESVAPVASEEVK

gene="Hol" (Lactobacillus bacteriophage phig1e)

product="holin"

protein_id="CAA66751.1"

db_xref="GI:1926366"

translation="MDIITSLNLATAGELALISFFIGVIVQAIIKKTGKVNTYLPFISMGIGLAGLA VVVTKDITN
YLN GAVAGLVGAATSGLT DGLSVGTS AVTTAKATKDAAKTAITQAVLNSINTTKSSDTTQVANTS
TEGGSTSETQK

product="holin" (Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis bacteriophage LL-H)

protein_id="AAC00556.1"

db_xref="GI:623083"

translation="MTLIDWFNLIVAIGTIALAVVASVYVHLKAKIDTKTAAGKAFDLVGKLAVWAVNEAEHSQ
DGGA AKREFAAKLISDQLKAKGITGIDEKMOVYGA VETAWKEA IENVK

product="holin protein" (Lactococcus phage c2)

protein_id="AAD20611.1"

db_xref="GI:4426933"

translation="MBTLRAIGLVVFMQLLSLALEFIDTGT LKPSVRKRIAVELMVL

gene="hol" (bacteriophage phiAM2)

note="hydrophobic pore-forming protein"

product="holin"

protein_id="AAG24367.1"

db_xref="GI:10880732"

translation="MFFNNKFYNVIKWA VLTALPALS VFIGVIGKAYGWGGTDLAITLNAFTVFLGTLAGVSAV
KYNSQPNDTKENK

product="holin"
 protein_id="AAG24367.1"
 translation="MFFNNKFYNVVKWAVLTALPALSFIGVIGKAYGWGGTDLAITLNAFTVFLGTLAGVSAV
 KYNSQPNDTKENK

product="holin" (Bacteriophage Tuc2009)
 protein_id="AAA32614.1"
 db_xref="GI:496282"
 translation="MNQINWKLRLKSKAFWLALLPALFLLIQAIGAPFGYKWDFVLNQQLAAVVNAAFALLAI
 VGVVADPTTSGLGSDRVLNKDKSEENK

product="holin" (Bacteriophage TPW22)
 function="formation of non-specific lesions in the cytoplasmic membrane"
 protein_id="AAF12704.1"
 db_xref="GI:6465904"
 translation="MNQINWKLRLKSKAFWLALLPALFLLIQAIGASFGYKWNFVLNQQLAAVVNAAFALLAI
 VGVVADPTTSGLGSDRVLNKDKSEENK

product="holin" (homology to Orf78 of phage HP1 and gene S of phage P21)
 protein_id="AAC45168.1"
 db_xref="GI:915370"
 translation="MRFNMLKNSETTGAYVGSALAIYSGFTLADWAAIFGILFGLFTMLINWYYKKN
 EIKLBETALKQKIDLKBGDHE

product="holin" (Bacillus phage GA-1)
 function="host cell lysis, holin formation"
 protein_id="CAC21535.1"
 db_xref="GI:12141291"
 translation="MFEFFHSLMBTDDTKVYFLLGIIGVLNIVDFFGFINAKFNKSLAYKSSKTIDGIMRKMKFTI
 MAILFIPVSVLMPPIGLGALYVFYFGYTYAELNSILSHLKLSEDGKETEVFLDFINIFFNSTKGDKKDD

gene="hol187" (Staphylococcus phage 187)
 function="forms pores to allow access of lysin to CW"
 product="holin protein Hol187"
 protein_id="CAA69023.1"
 db_xref="GI:2764984"
 translation="MLMVMVGNVGIYLTIFLIDTGTLRHQATQEIWHGIDILKGLKCLETLLILSLNQVI

gene="s" /function="holin" (Shigella dysenteriae)
 product="S protein"
 protein_id="CAC05628.1"
 db_xref="GI:9955825"
 translation="MYQMEKITTGVSYTTSAVGMGYWFLQFLDRVSPSQWAAIGVLGSLLFGLLTYLTNLYFKI
 REDRRKAARGE

gene="E"
 protein_id="CAA42879.1"
 db_xref="GI:14781"
 db_xref="SWISS-PROT:P31280"
 translation="MERWTLLDILAFLLLSLLPSLLIMFIPSMYKQHASLWKARSLAKTILSMASARLTPLSSS
 RTPCVLKQDSKKL

gene="xhIB" (B. subtilis DNA (28 kb PBSX/skin element region)
 product="holin-like protein"
 protein_id="CAA94048.1"
 db_xref="GI:1225964"
 db_xref="SWISS-PROT:Q99163"
 translation="MNTFDKGTVRTVLLLIALLNQTMMLGKSPLDIQEEQVNQLADALYSAGSIAFTIGTTLAA
 WFKNNYVTEKGGKQRDLLRDNNLTK

6/16

gene="bhlA" (Bacillus subtilis 168 prophage)
 product="holin-like protein"
 protein_id="AAC38301.1"
 db_xref="GI:2997596"
 translation="MEMDITQYLSTQGPFAVLFCWLLFYVMKTSKERESKLYNQIDSQNEVLGKFSEKYDVVIE
 KLDKIEQNFK"

gene="bhlB" (Bacillus subtilis 168 prophage)
 product="holin-like protein"
 protein_id="AAC38302.1"
 db_xref="GI:2997597"
 translation="MFENIDKGTIVRTLALLAIALLNQIMVMLGKAAFIINEEDINHLYDCLYTIFTIVFTTSTITAA
 WFKNNYITAKGKKQKQVLKKNLKF"

gene="hol" (Bacteriophage phi-Balh)
 specific_host="Erwinia amylovora"
 function="pore formation"
 product="holin"
 protein_id="CAC17008.1"
 db_xref="GI:11342496"
 translation="MRKIYVVIITTVVAGLIWAFIATQVNTGVTSKRQEDALAVSEANVGIGKBAKDQGEQATK
 RADVAKEQRTHQINQLKDKLHEKAESYDSIPLSPSDVDILC RAYRSTDPVCSPVTKSD"

Fig. 3(4)

7/16

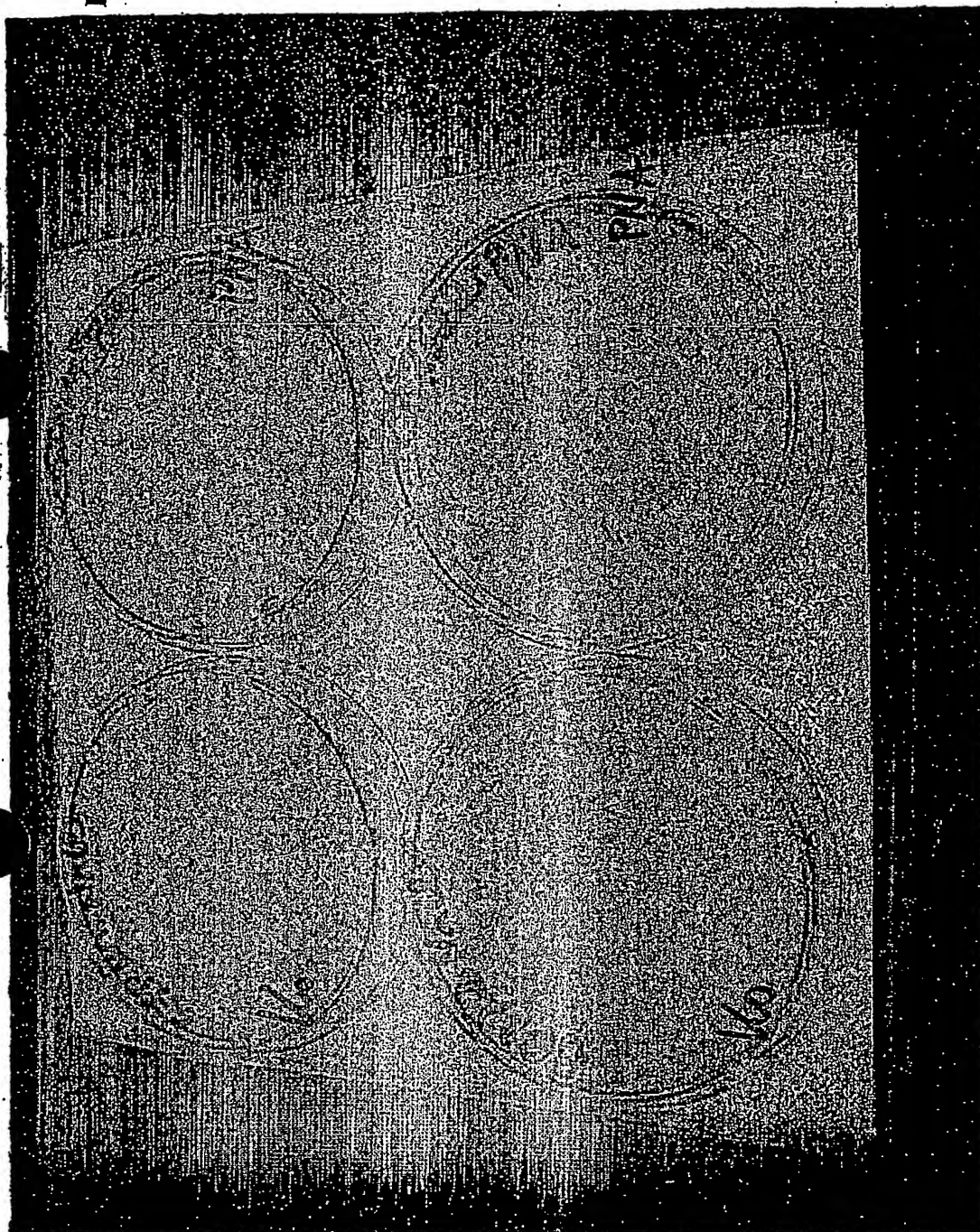
Alignments Lysis-Protein (Phagen)

product="lysis protein" (Phage phiX174)
 function="host cell lysis"
 protein_id="CAA84691.1"
 translation="MVRWTLWDTLAFLLLSLLPSLLIMFIPSTFKRPVSSWKALNLRKTLLMASSVRLKPLNCS
 RLPCVYAQETLTFLLTQKKTCVKNYVQKE"

Fig. 3(5)

kompetente Bakt. + Plasma+PNA
vorinkubiert

0,5 μ M PNA



R-KAN

8/16

R-AMP

Fig. 4

28

Intakte Bakt. + Inkubation mit α -Kan-PNA

E.K. PNA-Konstr.
 $\approx 2 \mu\text{M}$

9/16

$\approx 2 \mu\text{M}$

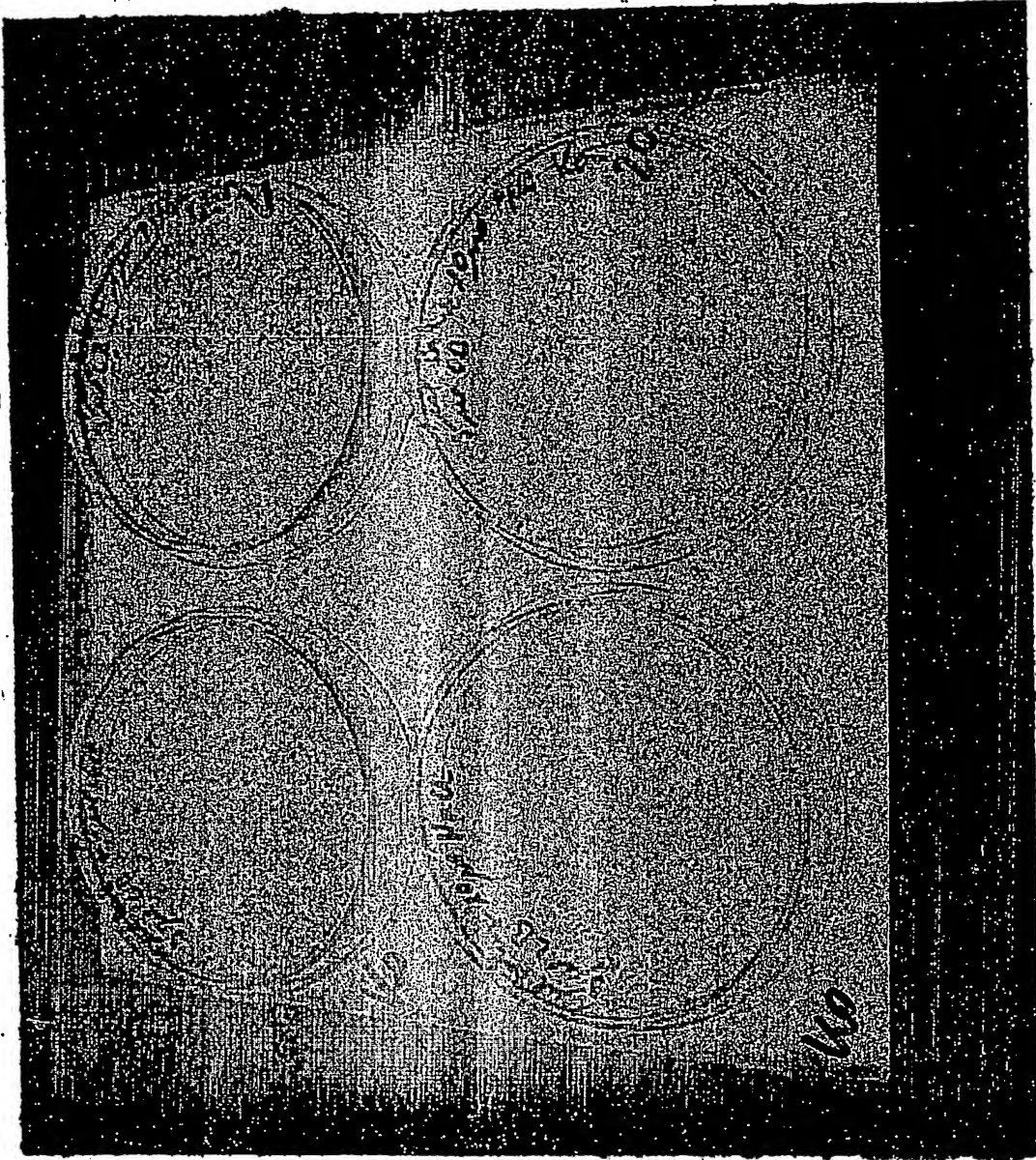


Fig. 5

Verdünnungs-Reihe Bak. (E. coli)
mit Kan, R-Plasmod

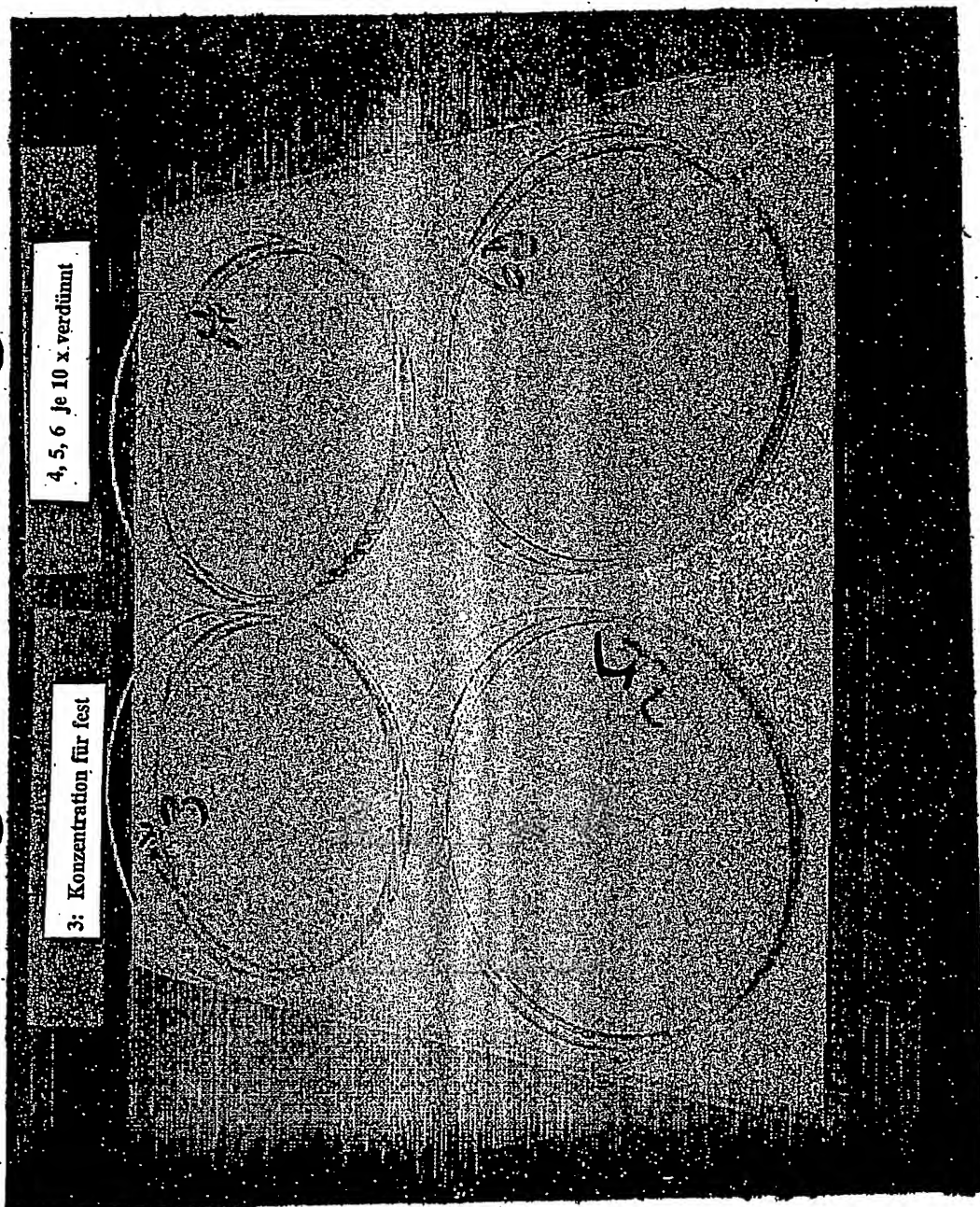


Fig. 6

11/16

3333 3333 3333 3333 3333 3333 3333 3333

31

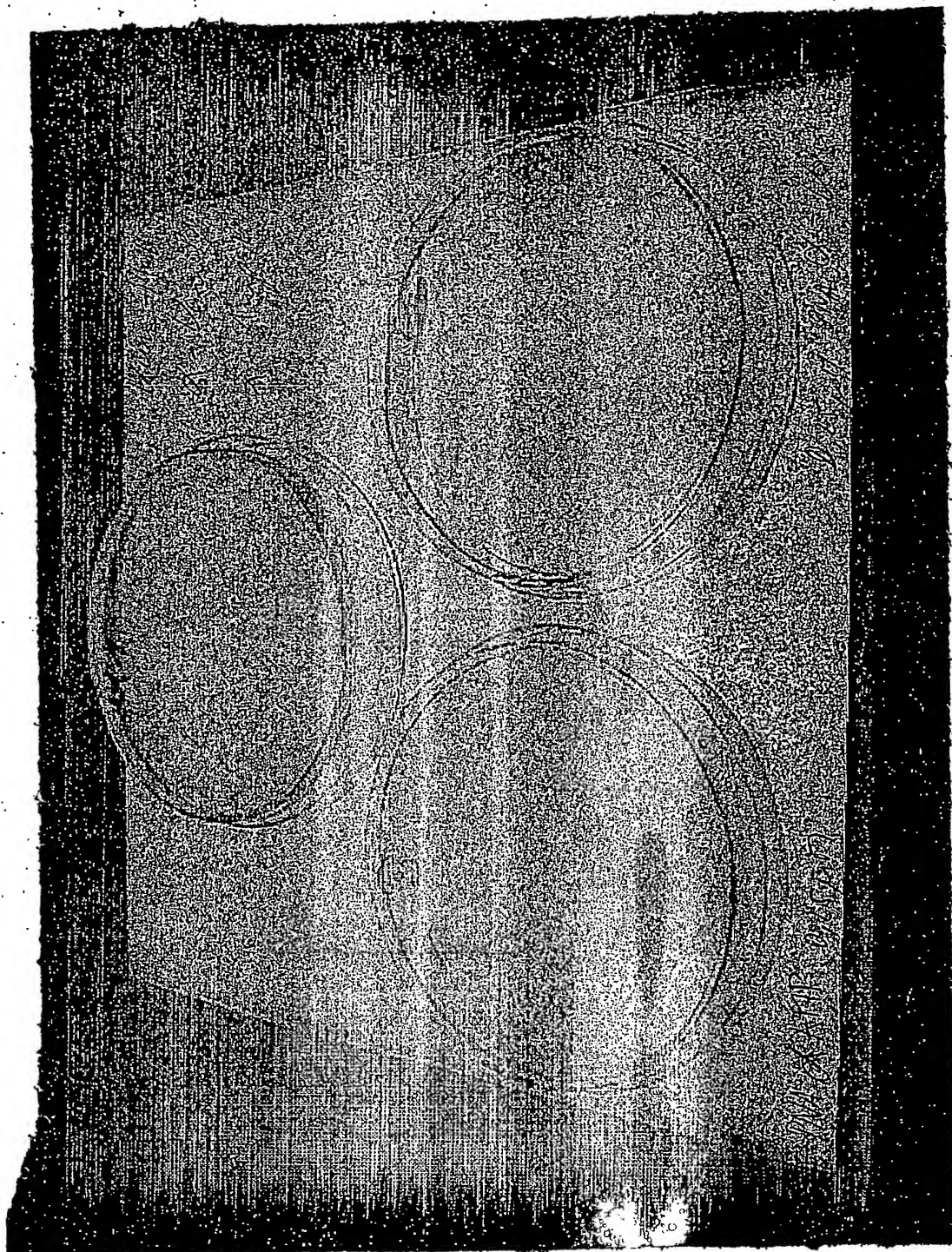


Fig. 7

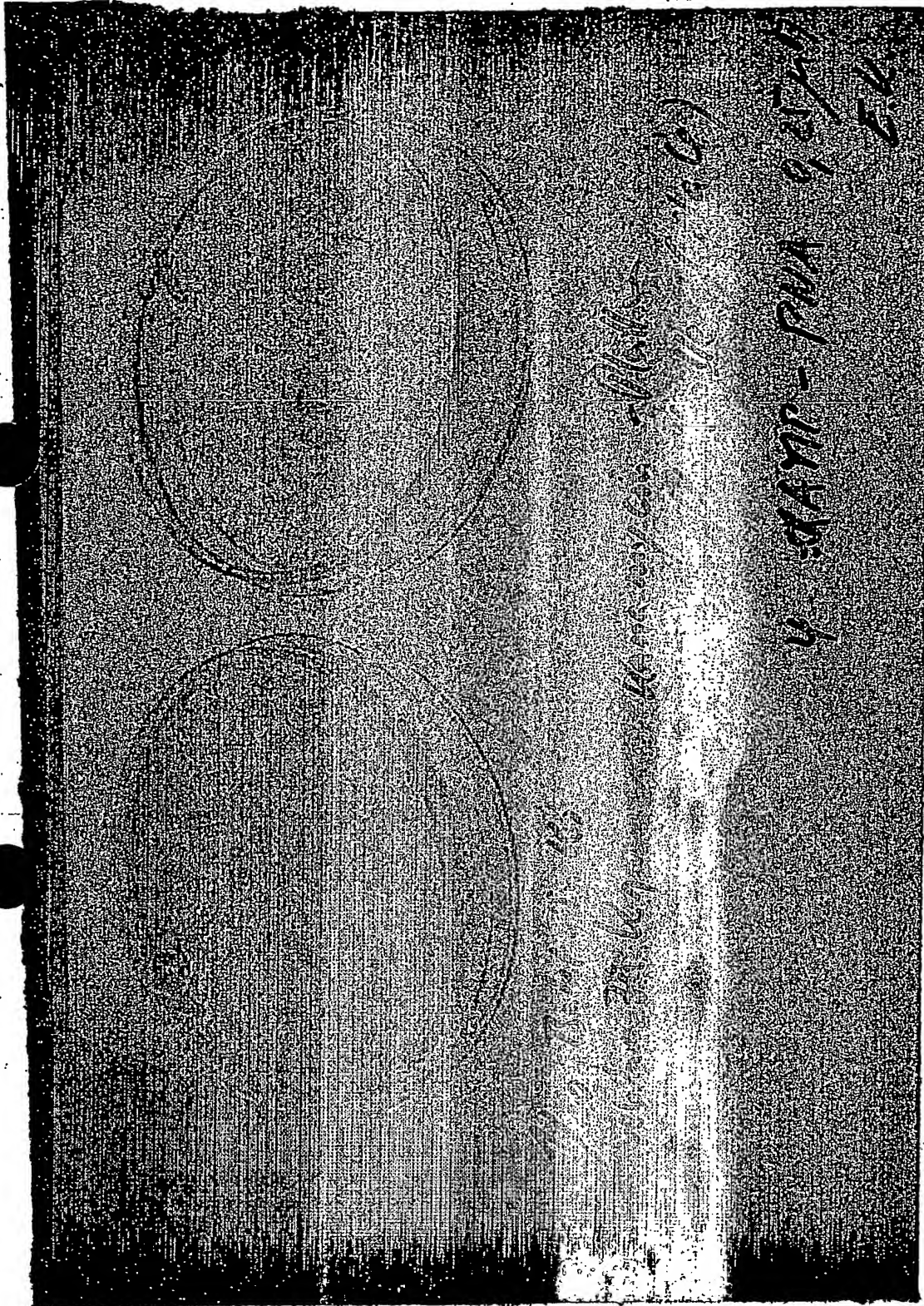


Fig. 8

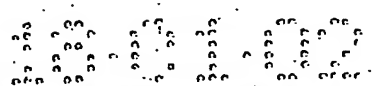


Fig. 9

SECRET

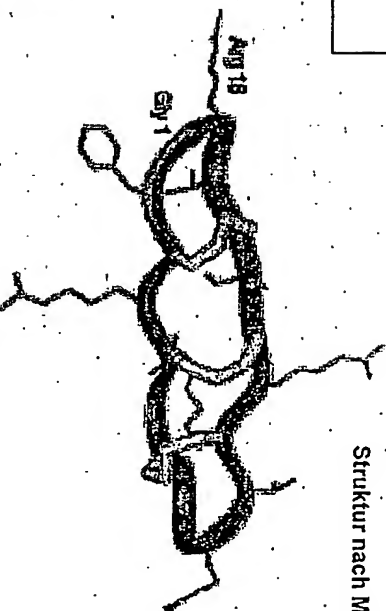


Fig. 10

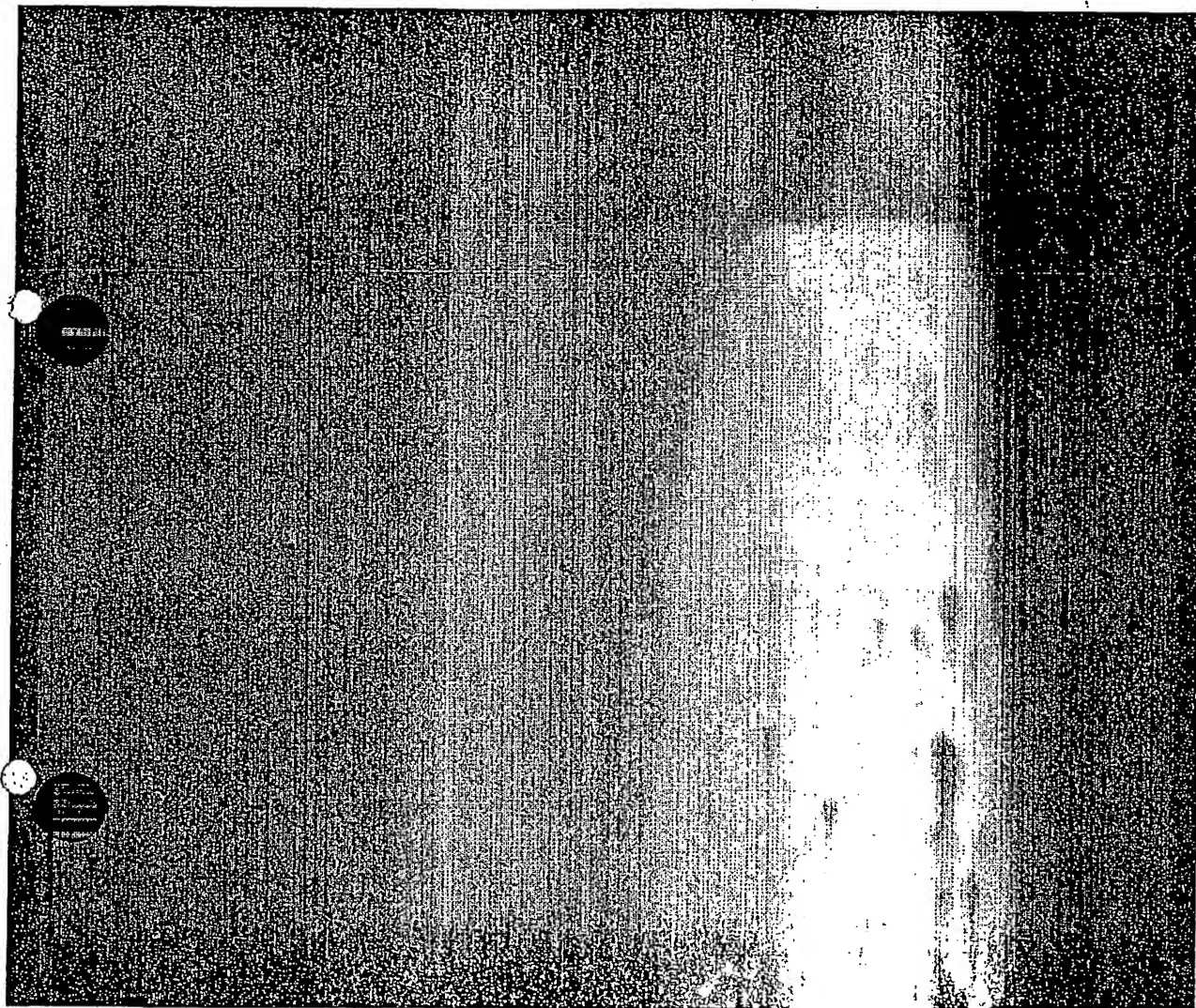


Fig. 11(A)

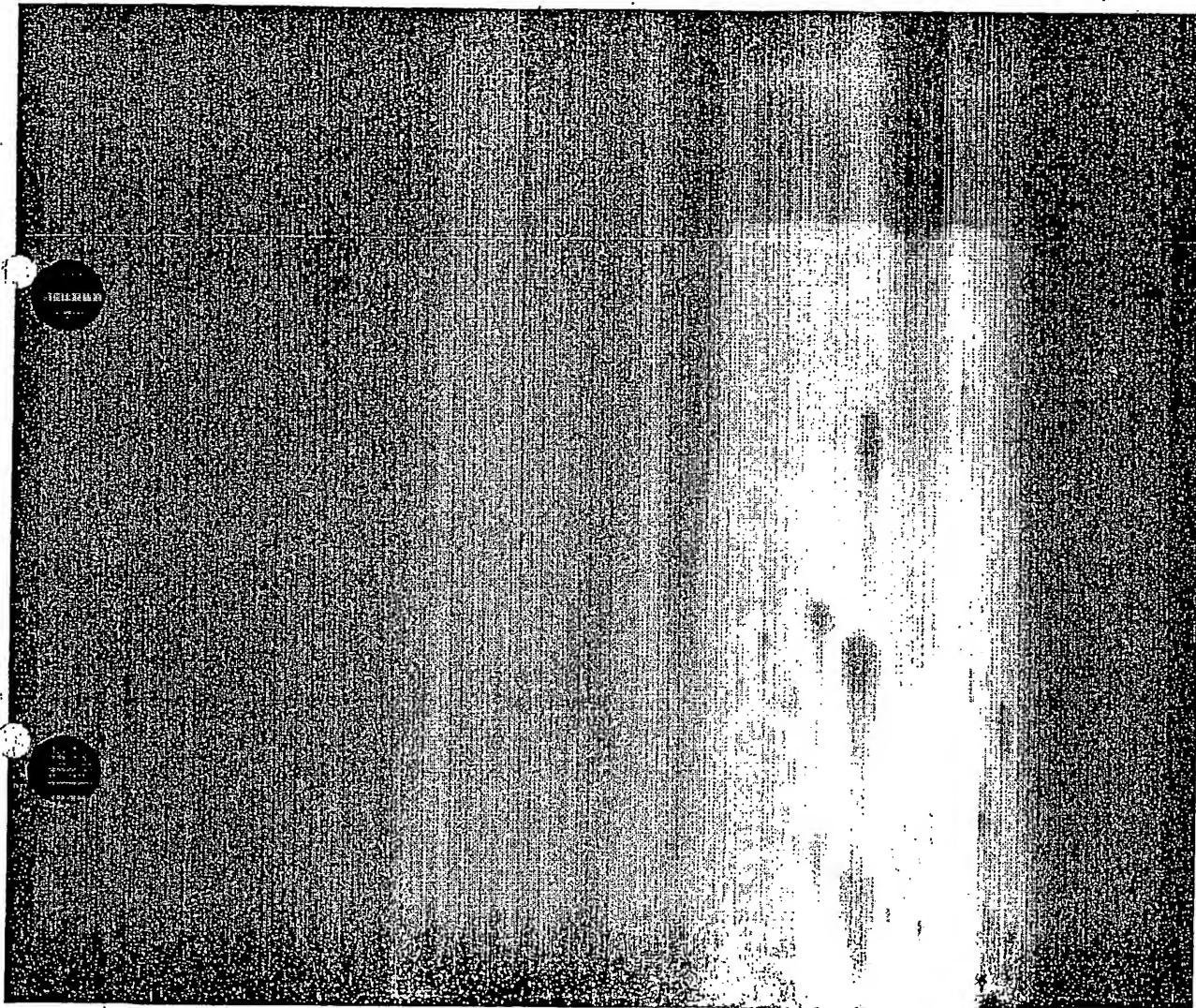


Fig. 11(B)